


29.08.03

JAPAN PATENT OFFICE

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.



【書類名】 特許願  
【整理番号】 A21726A  
【提出日】 平成14年11月25日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡西合志町豊岡 2 5 2 7 - 4 6 4

【氏名】 中面哲也

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市長嶺西 2 丁目 9 - 5 2

【氏名】 西村泰治

【特許出願人】

【識別番号】 801000050

【氏名又は名称】 財団法人くまもとテクノ産業財団

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-255668

【出願日】 平成14年 8月30日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脾癌・大腸癌の抗原、抗原をコードするDNA、ペプチド、  
蛋白、該抗原により誘導される抗体、キラーT細胞、およびその用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(A)又は(B)の何れかの蛋白質。

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(B) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質。

【請求項2】 請求項1に記載の蛋白質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド。

【請求項3】 癌抗原蛋白質を認識する細胞障害性T細胞を活性化しうる、請求項2に記載のペプチド。

【請求項4】 ペプチドが下記(1)～(5)式からなるアミノ酸配列のペプチドであることを特徴とする請求項2又は3に記載のペプチド。

Asn-Try-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu ... (1)

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu ... (2)

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile ... (3)

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu ... (4)

Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile ... (5)

【請求項5】 請求項1に記載の蛋白質をコードするDNA。

【請求項6】 下記(a)、(b)又は(c)の何れかのDNA。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(c) 上記(a)又は(b)のDNAの部分配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項7】 請求項1記載の蛋白質又は請求項2から4の何れかに記載のペプチドに対する抗体。

【請求項 8】 請求項1記載の蛋白質又は請求項 2 から 4 の何れかに記載のペプチドを用いてインビトロ刺激により誘導された細胞傷害性 T 細胞。

【請求項 9】 請求項1記載の蛋白質又は請求項 2 から 4 の何れかに記載のペプチドを含む癌ワクチン。

【請求項 10】 アジュバンドをさらに含む請求項 9 に記載の癌ワクチン。

【請求項 11】 請求項 5 又は 6 に記載の DNA、又は該 DNA を含む組換えウイルス若しくは組換え細菌を含む、癌ワクチン。

【請求項 12】 アジュバンドをさらに含む請求項 11 に記載の癌ワクチン。  
。

【請求項 13】 請求項 5 又は 6 に記載の DNA を含む、癌診断用プローブ。  
。

【請求項 14】 請求項 13 に記載の癌診断用プローブ及び／又は請求項 7 に記載の抗体を含む、癌診断薬。

【請求項 15】 請求項1に記載の蛋白質、請求項 2 から 4 の何れかに記載のペプチド、請求項 7 に記載の抗体、及び／又は請求項 8 に記載の細胞傷害性 T 細胞を含む、癌の予防・治療薬。

【請求項 16】 癌が脾癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌又は肉腫である、請求項 13 から 15 の何れかに記載のプローブ又は薬剤。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、脾癌・大腸癌を含む各種癌の診断や免疫療法などに有用な新規なヒト脾癌・大腸癌抗原、及びその利用等に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

現在、死亡原因の第一位となっている癌においては、その発生機序、診断法、治療法が進歩したにもかかわらず、未だに多くの進行癌を治療できないのが現状

である。これを改善するためには、新しい早期診断法と治療法の開発が必要とされている。

#### 【0003】

癌の治療法として免疫療法は古くから期待され、様々な試みがなされてきたが、まだ十分な抗腫瘍効果を示すには至っていない。従来、癌の免疫療法は非特異的免疫療法を中心として行われてきたが、近年、T細胞が生体内での腫瘍拒絶に重要な役割を果たすことが明らかになり、細胞傷害性T細胞（CTL: cytotoxic T lymphocyte）を誘導しうるT細胞認識腫瘍抗原の単離とMHCクラスI拘束性エピトープの決定に努力がそそがれている。

#### 【0004】

従来、多くの腫瘍抗原の単離としてCTLを用いたcDNA発現クローニング法で行われてきたが、腫瘍の細胞株化とCTLの樹立が必要であることから、メラノーマ以外の癌腫からの腫瘍抗原の単離は困難である。また、免疫治療法の効果を上げるために、多くのペプチドをミックスした治療法が有効と考えられているが、それを確立するためには、数多くの抗原の単離が必要であり、従来のcDNA発現クローニング法は、1つの抗原の単離に多くの労力と時間を費やすという問題があった。

#### 【0005】

1995年にドイツのPfreundschuhや米国のOldらのグループにより、癌患者血清中の抗体が認識する癌抗原タンパクを検出するSEREX法(serological identification of recombinant cDNA expression cloning; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11810-11813, 1995)が報告されている。この方法によって多くの腫瘍抗原が単離されているが、本方法を用いて単離された抗原の中にはCTLを誘導するMAGE-1やチロシナーゼなどの抗原がみられることから、細胞性免疫が認識する抗原を検出する方法としても有用であることが指摘されている。また、上記方法を用いて患者IgG抗体が認識する癌抗原を単離した報告もなされている(Int. J. Cancer 72, 965-971, 1997、Cancer Res. 58, 1034-1041, 1998、Int. J. Cancer 29, 652-658, 1998、Int. J. Oncol. 14, 703-708, 1999、Cancer Res. 56, 4766-4772, 1996、Hum. Mol. Genet 6, 33-39, 1997)。

## 【 0 0 0 6 】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、膵癌・大腸癌をはじめとする各種癌や腫瘍の診断・治療に応用することができるヒト膵癌・大腸癌抗原や、それをコードする遺伝子、それを用いた抗癌ワクチン等を提供することにある。

## 【 0 0 0 7 】

## 【課題を解決するための手段】

すなわち本発明によれば、下記（A）又は（B）の何れかの蛋白質が提供される。

（A）配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

（B）配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質。

## 【 0 0 0 8 】

本発明の別の側面によれば、上記の本発明の蛋白質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチドが提供される。

本発明のペプチドは、好ましくは、癌抗原蛋白質を認識する細胞障害性 T 細胞を活性化しうるペプチドである。

好ましくは、本発明のペプチドは下記（1）～（5）式からなるアミノ酸配列のペプチドである。

Asn-Try-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu                      …   （1）

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu                    …   （2）

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile                    …   （3）

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu                        …   （4）

Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile                    …   （5）

## 【 0 0 0 9 】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の蛋白質をコードする DNA が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記（a）、（b）又は（c）の何れかの

DNAが提供される。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(c) 上記(a)又は(b)のDNAの部分配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードするDNA。

#### 【0010】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の蛋白質又はペプチドに対する抗体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の蛋白質又はペプチドを用いてインビトロ刺激により誘導された細胞傷害性T細胞が提供される。

#### 【0011】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の蛋白質又はペプチドを含む癌ワクチンが提供される。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のDNA、又は該DNAを含む組換えウイルス若しくは組換え細菌を含む、癌ワクチンが提供される。本発明の癌ワクチンは、好ましくはアジュバンドをさらに含む。

#### 【0012】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のDNAを含む、癌診断用プローブが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の癌診断用プローブ及び／又は抗体を含む、癌診断薬が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の蛋白質、ペプチド、抗体、及び／又は細胞傷害性T細胞を含む、癌の予防・治療薬が提供される。

好ましくは、癌は膀胱癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌又は肉腫である。

#### 【0013】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳しく説明する。

(1) 本発明の蛋白質及びペプチド

本発明の肺癌・大腸癌から採取された蛋白質は、下記 (A) 又は (B) の何れかの蛋白質である。

(A) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質 (以下「h s p 1 0 5」とも言う)。

(B) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質。

【0014】

本明細書で言う免疫誘導活性を有する蛋白質とは、抗体産生、細胞性免疫等の免疫反応を誘導する活性を有する蛋白質を言うが、なかでも、細胞傷害性 T 細胞 (キラー T 細胞／C T L) を刺激する T 細胞誘導活性を有する蛋白質が特に好ましい。

【0015】

h s p 1 0 5 は h s p 1 1 0 / 1 0 5 ファミリーに属する高分子量の熱ショック蛋白で、h s p 1 0 5  $\alpha$  と 1 0 5  $\beta$  からなっている。1 0 5  $\alpha$  は 1 0 5 k D a の熱ショック蛋白で、様々なストレスで誘導される。1 0 5  $\beta$  は 1 0 5  $\alpha$  の m R N A がスプライシングにより産生される 1 0 5  $\alpha$  より分子量の小さい蛋白である。本発明の肺癌・大腸癌抗原である h s p 1 0 5 は例えば、本明細書の下記実施例のような S E R E X 法で検出することができる。

【0016】

上記した「配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列」における「1 若しくは数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1 から 2 0 個、好ましくは 1 から 1 0 個、より好ましくは 1 から 7 個、さらに好ましくは 1 から 5 個、特に好ましくは 1 から 3 個程度を意味する。

【0017】

本発明の蛋白質の入手・製造方法は特に限定されず、天然由来の蛋白質でも、



化学合成した蛋白質でも、遺伝子組み換え技術により作製した組み換え蛋白質の何れでもよい。比較的容易な操作でかつ大量に製造できるという点では、組み換え蛋白質が好ましい。

#### 【0018】

天然由来の蛋白質を入手する場合には、該蛋白質を発現している細胞又は組織から蛋白質の単離・精製方法を適宜組み合わせて単離することができる。化学合成蛋白質を入手する場合には、例えば、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法に従って本発明の蛋白質を合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して本発明の蛋白質を合成することもできる。

#### 【0019】

本発明の蛋白質を組み換え蛋白質として産生するには、該蛋白質をコードする塩基配列(例えば、配列番号2に記載の塩基配列)を有するDNA又はその変異体又は相同体を入手し、これを好適な発現系に導入することにより本発明の蛋白質を製造することができる。

#### 【0020】

発現ベクターとしては、好ましくは宿主細胞において自立複製可能であるか、あるいは宿主細胞の染色体中へ組込み可能であるものであればよく、本発明の遺伝子を発現できる位置にプロモーターを含有しているものが使用される。また、本発明の蛋白質をコードする遺伝子を有する形質転換体は、上記の発現ベクターを宿主に導入することにより作製することができる。宿主は、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞のいずれでもよく、また宿主への発現ベクターの導入は、各宿主に応じた公知の手法により行えばよい。

#### 【0021】

本発明においては、上記のようにして作製した本発明の遺伝子を有する形質転換体を培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より本発明の蛋白質を採取することにより組み換え蛋白質を単離することができる。

#### 【0022】

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、

これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。また培養条件も該微生物を培養するのに通常用いられる条件にて行えばよい。培養後、形質転換体の培養物から本発明の蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

#### 【0023】

なお、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有する蛋白質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA配列の一例示す配列番号2に記載の塩基配列の情報に基づいて当業者であれば適宜製造又は入手することができる。

#### 【0024】

即ち、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加を含むアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子（変異遺伝子）は、化学合成、遺伝子工学的手法又は突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法で作製することもできる。具体的には、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAを利用し、これらDNAに変異を導入することにより変異DNAを取得することができる。

#### 【0025】

例えば、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的手法等を用いて行うことができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989（以下、モレキュラークローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）等に記載の方法に準じて行うことができる。

#### 【0026】

本発明はさらに、上記した本発明の蛋白質の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチドにも関する。本発明のペプチドは、癌抗原蛋白質を認識する細胞障害性T細胞を活性化しうるものが好ましい。このようなペプチドの具体例としては、下記の何れかのアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

【0027】

Asn-Try-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu ... (1)

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu ... (2)

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile ... (3)

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu ... (4)

Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile ... (5)

【0028】

本発明のペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法に従って合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して本発明のペプチドを合成することもできる。

【0029】

(2) 本発明のDNA

本発明のDNAは、上記(1)に記載した本発明の蛋白質をコードするDNAであり、好ましくは、下記(a)、(b)又は(c)の何れかのDNAである。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(c) 上記(a)又は(b)のDNAの部分配列を有し、かつ、免疫誘導活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0030】

上記した「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、DNAをプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味し、例えば、コロニーあるいは

ブランク由来のDNA又は該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2×SSC溶液（1×SSC溶液は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラークローニング第2版等に記載されている方法に準じて行うことができる。

#### 【0031】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げられ、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAが挙げられる。

#### 【0032】

本発明のDNAの取得方法は特に限定されない。本明細書中の配列表の配列番号1および配列番号2に記載したアミノ酸配列及び塩基配列の情報に基づいて適当なプローブやプライマーを調製し、それらを用いてヒトなどのcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより本発明のDNAを単離することができる。cDNAライブラリーは、本発明のDNAを発現している細胞、器官又は組織から作製することが好ましい。

#### 【0033】

PCR法により配列番号2に記載した塩基配列を有するDNAを取得することもできる。ヒト染色体DNA又はcDNAライブラリーを鋳型として使用し、配列番号2に記載した塩基配列を増幅できるように設計した1対のプライマーを用いてPCRを行う。PCRの反応条件は適宜設定することができ、例えば、94℃で30秒間（変性）、55℃で30秒～1分間（アニーリング）、72℃で2分間（伸長）からなる反応工程を1サイクルとして、例えば30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件などを挙げることができる。次いで、増幅されたDNA断片を、大腸菌等の宿主で増幅可能な適切なベクター中にクローニング

することができる。

#### 【0034】

上記したプローブ又はプライマーの調製、cDNAライブラリーの構築、cDNAライブラリーのスクリーニング、並びに目的遺伝子のクローニングなどの操作は当業者に既知であり、例えば、モレキュラークローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法に準じて行うことができる。

#### 【0035】

##### (3)本発明の抗体及び細胞障害性細胞

本発明は、上記した本発明の蛋白質またはペプチドの一部もしくは全部をエпитープ（抗原）として認識する抗体、並びに該蛋白質又はペプチドを用いてインビトロ刺激により誘導された細胞傷害性（キラー）T細胞（CTL）にも関する。一般的には、CTLのほうが抗体よりも強い抗腫瘍活性を示す。

#### 【0036】

本発明の抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、その作製は定法により行なうことができる。

#### 【0037】

例えば、ポリクローナル抗体は、本発明の蛋白質を抗原として哺乳動物を免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等の哺乳動物を免疫することができる。免疫感作の方法は当業者に公知であり、例えば抗原を、例えば7～30日間隔で2～3回投与すればよい。投与量は1回につき、例えば抗原約0.05～2mg程度とすることができる。投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹腔腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができる。また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバント又は水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができる。

#### 【0038】

免疫感作した哺乳動物を一定期間飼育した後、抗体価が上昇してきたら、例えば  $100\mu\text{g} \sim 1000\mu\text{g}$  の抗原を用いて追加免疫を行なうことができる。最後の投与から 1～2 ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウム又はポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の常法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清として、本発明の蛋白質を認識するポリクローナル抗体を得ることができる。

#### 【0039】

一方、モノクローナル抗体はハイブリドーマを調製して得ることができる。例えば、抗体産生細胞とミエローマ細胞株との細胞融合によりハイブリドーマを得ることができる。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下のような細胞融合法によって得ることができる。

#### 【0040】

抗体産生細胞としては、免疫された動物からの脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等を使用する。抗原としては、本発明の蛋白質又はその部分ペプチドを使用する。免疫動物としてはマウス、ラット等を使用でき、これらの動物への抗原の投与は常法により行う。例えば完全フロインドアジュバント、不完全フロインドアジュバントなどのアジュバントと抗原である本発明の蛋白質との懸濁液もしくは乳化液を動物の静脈、皮下、皮内、腹腔内等に数回投与することによって動物を免疫化する。免疫化した動物から抗体産生細胞として例えば脾細胞を取得し、これとミエローマ細胞とを公知の方法 (G.Kohler et al., Nature, 256 495 (1975)) により融合してハイブリドーマを作製することができる。

#### 【0041】

細胞融合に使用するミエローマ細胞株としては、例えばマウスでは P3X63Ag8、P3U1 株、Sp2/0 株などが挙げられる。細胞融合を行なうに際しては、ポリエチレングリコール、センダイウイルスなどの融合促進剤を用い、細胞融合後のハイブリドーマの選択にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (HAT) 培地を常法に従って使用する。細胞融合により得られるハイブリド

ーマは限界希釈法等によりクローニングする。さらに必要に応じて、本発明の蛋白質を用いた酵素免疫測定法によりスクリーニングを行うことにより、本発明の蛋白質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する細胞株を得ることができる。

#### 【0042】

このようにして得られたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常の細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。培養上清もしくは腹水からのモノクローナル抗体の精製は、常法により行なうことができる。例えば、硫酸分画、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを適宜組み合わせて使用できる。

#### 【0043】

また、上記した抗体の断片も本発明の範囲内である。抗体の断片としては、F(a b')<sub>2</sub>フラグメント、F a b' フラグメント等が挙げられる。

#### 【0044】

さらに、上記した抗体の標識抗体も本発明の範囲内である。即ち、上記のようにして作製した本発明の抗体は標識して使用することができる。抗体の標識の種類及び標識方法は当業者に公知である。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼなどの酵素標識、F I T C (フルオレセインイソチオシアネート) 又はT R I T C (テトラメチルローダミンBイソチオシアネート) 等の蛍光標識、コロイド金属および着色ラテックスなどの呈色物質による標識、ビオチンなどのアフィニティー標識、あるいは<sup>125</sup>Iなどの同位体標識などを挙げることができる。本発明の標識抗体を用いた本発明の蛋白質(即ち、癌抗原)の分析又は測定は、酵素抗体法、免疫組織染色法、免疫プロット法、直接蛍光抗体法又は間接蛍光抗体法等の当業者に周知の方法に従って行うことができる。

#### 【0045】

本発明はまた、本発明の蛋白質又はペプチドを用いたインビトロ刺激により誘導された活性化T細胞に関する。例えば、末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球を本発明の蛋白質又はペプチドでインビトロ刺激すると腫瘍反応性活性化T細胞が

誘導され、この活性化されたT細胞は養子免疫療法に有効に用いることができる。また本発明の蛋白質又はペプチドを強力な抗原提示細胞である樹状細胞にインビボあるいはインビトロで発現させて、その抗原発現樹状細胞投与により免疫誘導を行うことができる。

#### 【0046】

##### (4) 本発明の癌ワクチン

本発明のDNA、蛋白質及びペプチドは、癌細胞特異的細胞障害性T細胞を誘導することができるので、癌の治療、予防剤として期待できる。例えば、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、この組換えDNAで形質転換されたBCG菌の細菌、または本発明のDNAをゲノムに組み込まれたワクシニアウイルス等のウイルスは、ヒト癌の治療・予防用生ワクチンとして有効に利用できる。なお、癌ワクチンの投与量及び投与法は通常の種痘やBCGワクチンと同様である。

#### 【0047】

即ち、本発明のDNA（そのまま、あるいは発現ベクターに組み込んだプラスミドDNAの形）、該DNAを含む組換えウイルス若しくは組換え細菌はそのままあるいはアジュバントに分散した状態で癌ワクチンとしてヒトを含む哺乳動物に投与することができる。本発明のペプチドも同様にアジュバンドと分散した状態で癌ワクチンとして投与することができる。

#### 【0048】

本発明で用いることができるアジュバントとしては、フロイントの不完全アジュバント、BCG、トレハロースダイマイコレート（TDM）、リポ多糖（LPS）、ミョウバンアジュバント、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関係から、フロイントの不完全アジュバント（FIA）を使用することが好ましい。

#### 【0049】

##### (5) 本発明の癌診断用プローブ、癌診断薬、癌の予防・治療薬

本発明のDNAは各種ヒト癌のDNAを取り出してその相同性を調べることで診断用プローブとして使用することができる。また、このプローブや前記抗体を使用して癌診断薬として使用することができる。



## 【0050】

即ち、本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を含む癌診断用プローブに関する。さらに本発明は、上記の癌診断用プローブ又は本発明の蛋白質に対する抗体を含む、癌診断薬に関する。本発明の癌診断用プローブとしては、本発明の蛋白質をコードするDNA（cDNA）又はRNA（cRNA）のアンチセンス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ（少なくとも20ベース以上）を有するものが好ましい。例えば、上記アンチセンス鎖を用いて検体から得られた本発明の蛋白質（癌抗原）のmRNAを検出することにより、癌の診断が可能となる。検出に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又はcDNAを挙げることができるがこれらに限定されるものではない。かかる検体を使用する場合、PCR等により増幅したものをを用いてもよい。

## 【0051】

本明細書で言う癌の種類は特に限定されず、具体例としては、脾癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌又は肉腫などが挙げられる。

## 【0052】

癌患者の癌細胞に対する免疫応答は予想以上に活発であり、多種多様な蛋白に対してIgG抗体が産生されていることを見出している。本発明の抗原蛋白であるhsp105は後述の実施例に示すように脾癌・大腸癌で特異的に高発現する。

## 【0053】

本発明の蛋白質又はペプチドは、T細胞エピトープとして癌細胞特異的細胞傷害性T細胞を誘導することができるので、ヒト癌の予防・治療剤として有用である。また、本発明の抗体も、癌抗原である本発明の蛋白質の活性を阻害することができるものであれば、ヒト癌の予防・治療剤として有用である。実際の使用法としては、本発明の蛋白質、ペプチド又は抗体をそのまま、又は医薬的に許容さ

れる担体及び／又は希釈剤とともに、必要に応じて下記の補助剤も加えて、注射剤として投与することもできるし、噴霧などの方法で粘膜からの経皮吸収などで投与してもよい。尚、ここで言う担体とは例えば、ヒト血清アルブミンであり、また希釈剤としては、例えばPBS、蒸留水等を挙げることができる。

#### 【0054】

投与量は成人1人当たり、本発明の蛋白質、ペプチド又は抗体を例えば、1回当たり0.01mg～100mgの範囲になるように投与することができるが、この範囲に限定されるものではない。製剤の形態も特に限定されず、凍結乾燥したものや、糖などの賦形剤を加えて顆粒にしたものでもよい。

#### 【0055】

本発明の薬剤に添加することができる細胞障害性T細胞誘導活性を高めるための補助剤としては、BCG菌などの菌体成分、Nature, vol. 344, p873 (1990)に記載されるISCOM、J. Immunol. vol. 148, p1438 (1992)に記載されるサポニン系のQS-21、リポソーム、水酸化アルミニウムなどが挙げられる。また、レンチナン、シゾフィラン、ピシバーニールなどの免疫賦活剤を補助剤として用いることもできる。また、IL-2、IL-4、IL-12、IL-1、IL-6、TNFなどのT細胞の増殖、分化を増強するサイトカイン等も補助剤として用いることができる。

#### 【0056】

また、患者から採取した細胞または、同一のHLAパプロタイプを持つ細胞に試験管内で当該抗原ペプチドを加え、抗原提示させた後、患者血管内に投与し、患者体内で効果的に細胞傷害性T細胞を誘導することもできる。また、患者末梢血リンパ球に当該ペプチドを加えて試験管内で培養することにより試験管内で細胞傷害性T細胞を誘導した後に患者血管内に戻すこともできる。このような細胞移入による治療は既に癌治療法として実施されており、当業者間ではよく知られた方法である。

#### 【0057】

特異的抗腫瘍免疫療法の標的抗原となるものは、その抗原が細胞傷害性T細胞（キラーT細胞／CTL）の認識抗原であることが必要である。本発明の抗原は

日本人に多いHLA-A24において、インビトロにおけるキラーT細胞誘導活性を増大させた。このことから本発明の抗原を体内に注入することにより、CTLを誘導活性化し、その結果、抗腫瘍効果が期待できる。また、本発明の抗原で刺激すると腫瘍部において活性化T細胞が誘導され、この活性化されたT細胞を患部に注入することによる養子免疫療法に有効に用いることができる。

【0058】

【実施例】

次に本発明の抗原、その製造方法、効果について実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら制約されるものではない。

【0059】

実施例1

《血清の採取》

肺癌患者から血清を採取した。採血後の血清は-80℃で保存した。この血清サンプルから、大腸菌とファージの溶解物とセファロース4Bが充填されたカラムを用いて大腸菌とλファージに対する抗体を除去した後、100～800倍に希釈し、使用した。

【0060】

《cDNAライブラリー／蛋白の作製》

Stratagene、La Jolla、CAより肺癌細胞株CFPAC-1のcDNAをλZAPエクスペクターに挿入してあるファージcDNAライブラリーを購入した。このファージcDNAライブラリーを大腸菌に感染させた後、NZYプレート培地上で42℃、6時間培養し溶菌斑（プラーク）を作らせた。isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) を浸透させたニトロセルロースメンブレンでプレートを37℃で3時間覆うことにより、プラーク中でλファージに組み込んだcDNAがコードする蛋白を作らせた。

【0061】

《イムノスクリーニング》

上記方法で産生した蛋白をニトロセルロースメンブレンに転写した。ブロッキング後のニトロセルロースを洗浄し、前記血清と4℃で15時間反応させた。洗

浄後 2 次抗体としてHorseradish Peroxidase(HRP)標識マウス抗ヒト I g G 抗体をメンブレンと反応させた。洗浄した後に、化学発光を X 線フィルム上で検出し、写真のプレートと照らし合わせ、陽性プラークを周囲の陰性プラークとともにピックアップした。発色反応陽性部位に一致するプラークを 1 5 c m N Z Y アガロースプレート上から採取し、S M 緩衝液 ( 1 0 0 m M の N a C l 、 1 0 m M の M g S O <sub>4</sub> 、 5 0 m M の T r i s - H C l 、 0 . 0 1 % のゼラチン ; p H 7 . 5 ) に溶解させた。発色反応陽性プラークが単一化するまで上記と同様の方法で 2 次、3 次スクリーニングを繰り返し、血清中の I g G 抗体が反応する単一のファージクローンを得た。以上の方法により脾癌細胞株由来の c D N A から 6 3 個の陽性クローンを単離した。

#### 【 0 0 6 2 】

##### 《単離抗原遺伝子の相同性検索》

P C R 法によりインサート D N A を増幅し、以後の解析に用いた。得られた P C R 産物を Big Dye DNA シーケンシングキット ( P E Biosystems, C A ) A シーケンシングを行い、塩基配列を決定した。上記決定された 6 3 種類の遺伝子の塩基配列を、それぞれ相同性検索プログラム B L A S T ( Basic Local Alignment Search Tool ) を用いて、N C B I データバンクに登録されている遺伝子情報と比較した。

#### 【 0 0 6 3 】

##### 《 h s p 1 0 5 》

その結果、表 1 の 1 8 個の陽性クローンを認めた。その 1 個が h s p 1 0 5 であった。

#### 【 0 0 6 4 】

【表 1】

TABLE 1 Genes Isolated by SEREX of a Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Line		
Gene designation	Gene/sequence identity	SEREX database search <sup>a</sup>
KM-PA-1	arg-2 (heat shock protein 110 family)	NGO-St-81, NY-CO-40, NY-CO-32
KM-PA-2	EST (KIAA0124)	
KM-PA-3	β-actin	
KM-PA-4	coactosin-like protein (CLP)	-
KM-PA-5	HALPHA44 (alpha-tubulin)	
KM-PA-6	unknown	
KM-PA-7	CDC-like kinase (CLK3)	-
KM-PA-8	cytokeratin 18	
KM-PA-9	polyA binding protein	
KM-PA-10	very-long-chain-acyl-CoA-dehydrogenase (VLCAD)	-
KM-PA-11	unknown	
KM-PA-12	HLA-Cw heavy chain (MHC Class I)	
KM-PA-13	unknown	LONY-BR-26
KM-PA-14	CGI 55 protein	
KM-PA-15	glycosylation-inhibiting factor (GIF)	
KM-PA-16	unknown	Mz19-16a, Hom-HD1-21 NGO-St-95, NGO-St-103
KM-PA-17	DNA binding protein A (dbpA)	
KM-PA-18	heat shock protein 105 (KIAA0201)	

<sup>a</sup> Dash means no strong homology.

【0065】

《h s p 1 0 5 発現の確認》

各種癌組織および正常組織における、h s p 1 0 5 蛋白の発現の有無を免疫組織化学的に解析した。その結果、図1および図2に示したようにh s p 1 0 5 は 肺癌組織及び大腸癌組織に発現することがわかった。

【0066】

## 実施例 2

## 《h s p 1 0 5 を構成するペプチド》

日本人の 60% が陽性の H L A - A 2 4 に結合するモチーフと B A L B / c マウスの K<sup>d</sup> の結合するモチーフはほとんど同じである。H L A - peptide binding prediction([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/))を用いて H L A - A 2 4 と K<sup>d</sup> の両方に結合すると予測されるヒト・マウス h s p 1 0 5 共通のペプチドを h s p 1 0 5 のシーケンスより選び出し、9 または 10 のアミノ酸からなる 9 種類のペプチドを Fmoc/PyBOP 法で合成した。ペプチドのシーケンスと H L A - A 2 4 への結合予測値を表 2 に示す。

【0067】

【表 2】

hsp105由来ペプチド			
hsp105-derived peptides			
No.	Position	Sequence	Binding Score
1	hsp105 180-188	NYGIYKQDL	2400
2	hsp105 214-223	AFNKGKCLKVL	960
3	hsp105 251-260	KYKLDKSKI	2880
4	hsp105 305-313	QFEELCAEL	1382
5	hsp105 433-442	TFLRRGPFEL	1920
6	hsp105 570-579	MYIETEGKMI	4800
7	hsp105 597-606	ECVYEFKDKL	80
8	hsp105 682-690	HYAKIAADF	60
9	hsp105 696-705	KYNHIDESEM	432

【0068】

## 実施例 3

## 《DNA ワクチン》

マウス h s p 1 0 5 c D N A を発現ベクター p C A G G S に組み込んだプラスミド D N A をそのまま適当な濃度に調整してワクチンとして以下の性能評価試験に使用した。なお、このマウス h s p 1 0 5 - p C A G G S D N A ワクチンは大腸菌を培養し、その後大腸菌からプラスミド D N A を取り出し、精製することにより大量に産生したものをを用いた。

## 【0069】

## 《ペプチドワクチンおよびDNAワクチンの抗癌効果》

BALB/cマウスの筋肉に①生理食塩水、②ベクターのみ、③hsp105 cDNAベクター、④アジュバントのみ、及び⑤アジュバント+ペプチドを注射し、同系マウス由来のhsp105を高発現する大腸癌細胞株Colon-26を背部皮下に移植して、マウスの癌の発症を（１）癌部の面積、（２）癌が生着したマウスの割合、（３）生存マウスの割合で評価した。結果を図3A、B、Cに示す。

## 【0070】

図3A、B、Cに示すように、 $3 \times 10^4$ 個のColon26を植えた場合、生食のみあるいは、pCAGGSのみを免疫したマウスには13日目までにそれぞれ5匹全例腫瘍が生着したが、hsp105-DNAエアクチンを免疫した5匹のうち、20日目に1匹、24日目に1匹腫瘍が生着したものの、残りの3匹は腫瘍を完全に拒絶した。アジュバント群は、24日目までに5匹全例腫瘍が生着した。DNAワクチン・ペプチドワクチン・アジュバント群と生食・ベクター群間に優位差を認めた（図3B）。腫瘍面積の平均においても同様の結果であった（図3A）。

## 【0071】

これらの結果からペプチドワクチンおよびDNAワクチンの抗癌剤としての効果は明らかである。全体の生存曲線でみると、生食・ベクター・アジュバント群は45日目でも5匹中2匹が生存しており、DNAワクチン群に至っては、5匹全例とも生存していた。DNAワクチン群は他の4群全てとの間に優位差を認めた。ペプチドワクチン群は生食・ベクター・アジュバント群との間に有意差をもって生存期間の延長を認めた（図3C）。更に、腫瘍を拒絶したマウスを病理学的に観察し、正常臓器への傷害がおこっていないことと、腫瘍を拒絶した局所に炎症細胞が多数浸潤していることを確認した。

## 【0072】

## 《hsp105のCTLエピトープペプチドの決定》

CTLエピトープペプチドを同定するため、DNAワクチン-ペプチドワクチンが有効であったマウスより脾臓細胞を回収し、9種類のペプチドで1回刺激し、 $^{51}\text{Cr}$  release assayによってColon-26に対する細胞傷害活性を検討した。

その結果、上記 9 種のペプチドの中では、下記 5 種類のペプチド 1、2、3、4、6 が有用であることを認めた (図 4)。

Asn-Try-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu ... (1)

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu ... (2)

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile ... (3)

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu ... (4)

Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile ... (5)

【0073】

《癌診断薬》

h s p 1 0 5 の抗体を用いて、膵癌・大腸癌の病理診断をすることができる。

【0074】

《CTL 癌治療薬》

マウスにおいて h s p 1 0 5 および／又は h s p 1 0 5 を構成するペプチドを抗原として認識するキラー T 細胞は正常細胞を傷付けず、マウス大腸癌にのみ細胞傷害活性を有することがわかった。h s p 1 0 5 は高発現するヒト膵癌・大腸癌における、副作用の少ない癌治療薬あるいは予防薬として使用することが出来る可能性がある。

【0075】

【発明の効果】

本発明の抗原蛋白、および抗原ペプチド、あるいは本発明の蛋白またはペプチドをコードする DNA は自己傷害性等の副作用が少なく優れた抗癌ワクチンとして使用することが出来る。また、抗体は診断薬として使用することができる。また本発明の抗原により刺激、活性化されたキラー T 細胞は抗癌剤として使用できる。

。

【0076】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kumamoto Technology and Industry Fundation

<120> A protein to be an immunogenic antigen for pancreatic cancer



<130> A21726A

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

【 0 0 7 7 】

<210> 1

<211> 858

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

Met Ser Val Val Gly Leu Asp Val Gly Ser Gln Ser Cys Tyr Ile Ala

1 5 10 15

Val Ala Arg Ala Gly Gly Ile Glu Thr Ile Ala Asn Glu Phe Ser Asp

20 25 30

Arg Cys Thr Pro Ser Val Ile Ser Phe Gly Ser Lys Asn Arg Thr Ile

35 40 45

Gly Val Ala Ala Lys Asn Gln Gln Ile Thr His Ala Asn Asn Thr Val

50 55 60

Ser Asn Phe Lys Arg Phe His Gly Arg Ala Phe Asn Asp Pro Phe Ile

65 70 75 80

Gln Lys Glu Lys Glu Asn Leu Ser Tyr Asp Leu Val Pro Leu Lys Asn

85 90 95

Gly Gly Val Gly Ile Lys Val Met Tyr Met Gly Glu Glu His Leu Phe

100 105 110

Ser Val Glu Gln Ile Thr Ala Met Leu Leu Thr Lys Leu Lys Glu Thr

115 120 125

Ala Glu Asn Ser Leu Lys Lys Pro Val Thr Asp Cys Val Ile Ser Val

130 135 140

Pro Ser Phe Phe Thr Asp Ala Glu Arg Arg Ser Val Leu Asp Ala Ala

145 150 155 160

Gln Ile Val Gly Leu Asn Cys Leu Arg Leu Met Asn Asp Met Thr Ala  
165 170 175  
Val Ala Leu Asn Tyr Gly Ile Tyr Lys Gln Asp Leu Pro Ser Leu Asp  
180 185 190  
Glu Lys Pro Arg Ile Val Val Phe Val Asp Met Gly His Ser Ala Phe  
195 200 205  
Gln Val Ser Ala Cys Ala Phe Asn Lys Gly Lys Leu Lys Val Leu Gly  
210 215 220  
Thr Ala Phe Asp Pro Phe Leu Gly Gly Lys Asn Phe Asp Glu Lys Leu  
225 230 235 240  
Val Glu His Phe Cys Ala Glu Phe Lys Thr Lys Tyr Lys Leu Asp Ala  
245 250 255  
Lys Ser Lys Ile Arg Ala Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Glu Cys Glu Lys  
260 265 270  
Leu Lys Lys Leu Met Ser Ser Asn Ser Thr Asp Leu Pro Leu Asn Ile  
275 280 285  
Glu Cys Phe Met Asn Asp Lys Asp Val Ser Gly Lys Met Asn Arg Ser  
290 295 300  
Gln Phe Glu Glu Leu Cys Ala Glu Leu Leu Gln Lys Ile Glu Val Pro  
305 310 315 320  
Leu Tyr Ser Leu Leu Glu Gln Thr His Leu Lys Val Glu Asp Val Ser  
325 330 335  
Ala Val Glu Ile Val Gly Gly Ala Thr Arg Ile Pro Ala Val Lys Glu  
340 345 350  
Arg Ile Ala Lys Phe Phe Gly Lys Asp Ile Ser Thr Thr Leu Asn Ala  
355 360 365  
Asp Glu Ala Val Ala Arg Gly Cys Ala Leu Gln Cys Ala Ile Leu Ser  
370 375 380  
Pro Ala Phe Lys Val Arg Glu Phe Ser Val Thr Asp Ala Val Pro Phe

385                      390                      395                      400  
Pro Ile Ser Leu Ile Trp Asn His Asp Ser Glu Asp Thr Glu Gly Val  
                         405                      410                      415  
His Glu Val Phe Ser Arg Asn His Ala Ala Pro Phe Ser Lys Val Leu  
                         420                      425                      430  
Thr Phe Leu Arg Arg Gly Pro Phe Glu Leu Glu Ala Phe Tyr Ser Asp  
                         435                      440                      445  
Pro Gln Gly Val Pro Tyr Pro Glu Ala Lys Ile Gly Arg Phe Val Val  
                         450                      455                      460  
Gln Asn Val Ser Ala Gln Lys Asp Gly Glu Lys Ser Arg Val Lys Val  
465                      470                      475                      480  
Lys Val Arg Val Asn Thr His Gly Ile Phe Thr Ile Ser Thr Ala Ser  
                         485                      490                      495  
Met Val Glu Lys Val Pro Thr Glu Glu Asn Glu Met Ser Ser Glu Ala  
                         500                      505                      510  
Asp Met Glu Cys Leu Asn Gln Arg Pro Pro Glu Asn Pro Asp Thr Asp  
                         515                      520                      525  
Lys Asn Val Gln Gln Asp Asn Ser Glu Ala Gly Thr Gln Pro Gln Val  
                         530                      535                      540  
Gln Thr Asp Ala Gln Gln Thr Ser Gln Ser Pro Pro Ser Pro Glu Leu  
545                      550                      555                      560  
Thr Ser Glu Glu Asn Lys Ile Pro Asp Ala Asp Lys Ala Asn Glu Lys  
                         565                      570                      575  
Lys Val Asp Gln Pro Pro Glu Ala Lys Lys Pro Lys Ile Lys Val Val  
                         580                      585                      590  
Asn Val Glu Leu Pro Ile Glu Ala Asn Leu Val Trp Gln Leu Gly Lys  
                         595                      600                      605  
Asp Leu Leu Asn Met Tyr Ile Glu Thr Glu Gly Lys Met Ile Met Gln  
                         610                      615                      620

Asp Lys Leu Glu Lys Glu Arg Asn Asp Ala Lys Asn Ala Val Glu Glu  
625 630 635 640  
Tyr Val Tyr Glu Phe Arg Asp Lys Leu Cys Gly Pro Tyr Glu Lys Phe  
645 650 655  
Ile Cys Glu Gln Asp His Gln Asn Phe Leu Arg Leu Leu Thr Glu Thr  
660 665 670  
Glu Asp Trp Leu Tyr Glu Glu Gly Glu Asp Gln Ala Lys Gln Ala Tyr  
675 680 685  
Val Asp Lys Leu Glu Glu Leu Met Lys Ile Gly Thr Pro Val Lys Val  
690 695 700  
Arg Phe Gln Glu Ala Glu Glu Arg Pro Lys Met Phe Glu Glu Leu Gly  
705 710 715 720  
Gln Arg Leu Gln His Tyr Ala Lys Ile Ala Ala Asp Phe Arg Asn Lys  
725 730 735  
Asp Glu Lys Tyr Asn His Ile Asp Glu Ser Glu Met Lys Lys Val Glu  
740 745 750  
Lys Ser Val Asn Glu Val Met Glu Trp Met Asn Asn Val Met Asn Ala  
755 760 765  
Gln Ala Lys Lys Ser Leu Asp Gln Asp Pro Val Val Arg Ala Gln Glu  
770 775 780  
Ile Lys Thr Lys Ile Lys Glu Leu Asn Asn Thr Cys Glu Pro Val Val  
785 790 795 800  
Thr Gln Pro Lys Pro Lys Ile Glu Ser Pro Lys Leu Glu Arg Thr Pro  
805 810 815  
Asn Gly Pro Asn Ile Asp Lys Lys Glu Glu Asp Leu Glu Asp Lys Asn  
820 825 830  
Asn Phe Gly Ala Glu Pro Pro His Gln Asn Gly Glu Cys Tyr Pro Asn  
835 840 845  
Glu Lys Asn Ser Val Asn Met Asp Leu Asp

850

855

【 0 0 7 8 】

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3612

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 2

gaggaagtgg gacctccct tttgggtcgg tagttcagcg ccggcgccgg tgtgcgagcc 60  
gcggcagagt gaggcaggca acccgaggtg cggagcgacc tgcggaggct gagccccgct 120  
ttctcccagg gtttcttata agccagccgc cgctgtcccc gggggagtag gaggtcctg 180  
acaggccgcg gctgtctgtg tgtccttctg agtgtcagag gaacggccag accccgcggg 240  
ccggagcaga acgcggccag ggcagaaagc ggcggcagga gaagcaggca gggggccgga 300  
ggacgcagac cgagaccga ggcgaggcg gaccgcgagc cggccatgtc ggtggtgggg 360  
ttggacgtgg gctgcagag ctgctacatc gcggtagccc gggccggggg catcgagacc 420  
atcgccaatg agttcagcga ccggtgcacc ccgtcagtca tatcatttgg atcaaaaaat 480  
agaacaatcg gagttgcagc caaaaatcag caaatcactc atgcaaaca tacggtgtct 540  
aacttcaaaa gatttcatgg ccgagcattc aacgaccct tcattcaaaa ggagaaggaa 600  
aacttgagtt acgatttggg tccattgaaa aatggtggag ttggaataaa ggtaatgtac 660  
atgggtgaag aacatctatt tagtgtggag cagataacag ccatgttggt gactaagctg 720  
aaggaaactg ctgaaaacag cctcaagaaa ccagtaacag attgtgttat ttcagtcccc 780  
tccttcttta cagatgctga gaggcgatct gtgttagatg ctgcacagat tgttggccta 840  
aactgtttta gacttatgaa tgacatgaca gctgttgctt tgaattacgg aatttataag 900  
caggatctcc caagcctgga tgagaaacct cggatagtgg tttttgttga tatgggacat 960  
tcagcttttc aagtgtctgc ttgtgctttt aacaagggaa aattgaagggt actgggaaca 1020  
gcttttgatc ctttcttagg aggaaaaaac ttcgatgaaa agttagtggga acatttctgt 1080  
gcagaattta aaactaagta caagttggat gcaaaatcca aaatacgagc actcctacgt 1140  
ctgtatcagg aatgtgaaaa actgaaaaag ctaatgagct ctaacagcac agaccttcca 1200  
ctgaatatcg aatgctttat gaatgataaa gatgtttccg gaaagatgaa caggtcacia 1260  
tttgaagaac tctgtgctga acttctgcaa aagatagaag tacccttita ttcactgttg 1320

gaacaaactc atctcaaagt agaagatgtg agtgcagttg agattgttgg aggcgctaca 1380  
cgaattccag ctgtgaagga aagaattgcc aaattctttg gaaaagatat tagcacaaca 1440  
ctcaatgcag atgaagcagt agccagagga tgtgcattac agtgtgcaat actttcccg 1500  
gcatttaaag ttagagaatt ttccgtcaca gatgcagttc cttttccaat atctctgata 1560  
tggaaccatg attcagaaga tactgaaggt gttcatgaag tcttttagtcg aaaccatgct 1620  
gctcctttct ccaaagttct cacctttctg agaagggggc cttttgagct agaagctttc 1680  
tattctgata cccaaggagt tccatatcca gaagcaaaaa taggccgctt tgtagttcag 1740  
aatgtttctg cacagaaaga tggagaaaaa tctagagtaa aagtcaaagt gcgagtcaac 1800  
acccatggca ttttcacat ctctacggca tctatgggtg agaaagtccc aactgaggag 1860  
aatgaaatgt cttctgaagc tgacatggag tgtctgaatc agagaccacc agaaaacca 1920  
gacactgata aaaatgtcca gcaagacaac agtgaagctg gaacacagcc ccaggtacaa 1980  
actgatgctc aacaaacctc acagtctccc cttcacctg aacttacctc agaagaaaac 2040  
aaaatcccag atgctgacaa agcaaatgaa aaaaaagttg accagcctcc agaagctaaa 2100  
aagcccaaaa taaaggtggg gaatgttgag ctgcctattg aagccaactt ggtctggcag 2160  
ttagggaaag accttcttaa catgtatatt gagacagagg gtaagatgat aatgcaagat 2220  
aaattggaaa aagaaaggaa tgatgctaaa aatgcagttg aggaatatgt gtatgagttc 2280  
agagacaagc tgtgtggacc atatgaaaaa ttatatgtg agcaggatca tcaaaatttt 2340  
ttgagactcc tcacagaaac tgaagactgg ctgtatgaag aaggagagga ccaagctaaa 2400  
caagcatatg ttgacaagtt ggaagaatta atgaaaattg gcactccagt taaagttcgg 2460  
tttcaggaag ctgaagaacg gccaaaaatg tttgaagaac taggacagag gctgcagcat 2520  
tatgccaaag tagcagctga cttcagaaat aaggatgaga aatacaacca tattgatgag 2580  
tctgaaatga aaaaagtgga gaagtctgtt aatgaagtga tggaatggat gaataatgtc 2640  
atgaatgctc aggctaaaaa gagtcttgat caggatccag ttgtacgtgc tcaggaaatt 2700  
aaaacaaaaa tcaaggaatt gaacaacaca tgtgaaccg ttgtaacaca accgaaacca 2760  
aaaattgaat cacccaaact ggaaagaact ccaaatggcc caaatattga taaaaaggaa 2820  
gaagatttag aagacaaaaa caattttggt gctgaacctc cacatcagaa tggatgaatg 2880  
taccctaatg agaaaaattc tgtaatatg gacttgact agataacctt aaattggcct 2940  
attccttcaa ttaataaaat atttttgcc tagtatgtga ctctacataa catactgaaa 3000  
ctatttatat tttctttttt aaggatatat agaaattttg tgtattatat ggaaaaagaa 3060

aaaaagctta agtctgtagt ctttatgata ctaaaaggga aaattgcctt ggtaactttc 3120  
agattcctgt ggaattgtga attcatacta agctttctgt gcagtctcac catttgcatc 3180  
actgaggatg aaactgactt ttgtcttttg gagaaaaaaa actgtactgt tgttcaagag 3240  
ggctgtgatt aaaatcttta agcatttggt cctgccaagg tagttttctt gcattttgct 3300  
ctccattcag catgtgtgtg ggtgtggatg tttataaaca agactaagtc tgacttcata 3360  
agggctttct aaaaccattt ctgtccaaga gaaaatgact ttttgctttg atattaaaaa 3420  
ttcaatgagt aaaacaaaag ctagtcaaag gtgttagcag catgcagaac aaaaacttta 3480  
aactttctct ctactatac agtatattgt caatgtgaaa gtgtggaatg gaagaaatgt 3540  
cgatcctgtt gtaactgatt gtgaacactt ttatgagctt taaaataaag ttcattttat 3600  
ggtgtcattt t 3612

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は脾癌における h s p 1 0 5 の免疫組織化学的解析結果を示した顕微鏡写真である。

A：脾癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色、CA：癌部、NP：非癌部を示す。

B：癌細胞に h s p 1 0 5 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。

C：非癌部の強拡大。細胞質に弱い h s p 1 0 5 蛋白の発現を認める。

D：癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に h s p 1 0 5 蛋白の高発現を認める。

【図 2】

図 2 は大腸癌における h s p 1 0 5 の免疫組織化学的解析結果を示した顕微鏡写真である。

A：大腸癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色、CA：癌部、NP：非癌部を示す。

B：癌細胞に h s p 1 0 5 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。

C：非癌部の強拡大。細胞質に弱い h s p 1 0 5 蛋白の発現を認める。

D：癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に h s p 1 0 5 蛋白の高発現を認める。

核にも弱い発現を認める。

【図 3】

図 3 はマウス大腸癌細胞Colon-26に対する h s p 1 0 5 のDNAワクチン、および h s p 1 0 5 ペプチドワクチン、及び対照品の抗癌効果を示したグラフである。Aは癌部の面積を、Bは癌が生着したマウスの割合、Cは生存マウスの割合を示す。

【図 4】

図 4 は h s p 1 0 5 蛋白由来の各種ペプチドワクチンまたは h s p 1 0 5 蛋白をコードするDNAワクチンのColon-26に対する細胞傷害活性を<sup>51</sup>Cr release assayにより測定した結果を示すグラフである。



【書類名】 図面

【図 1】

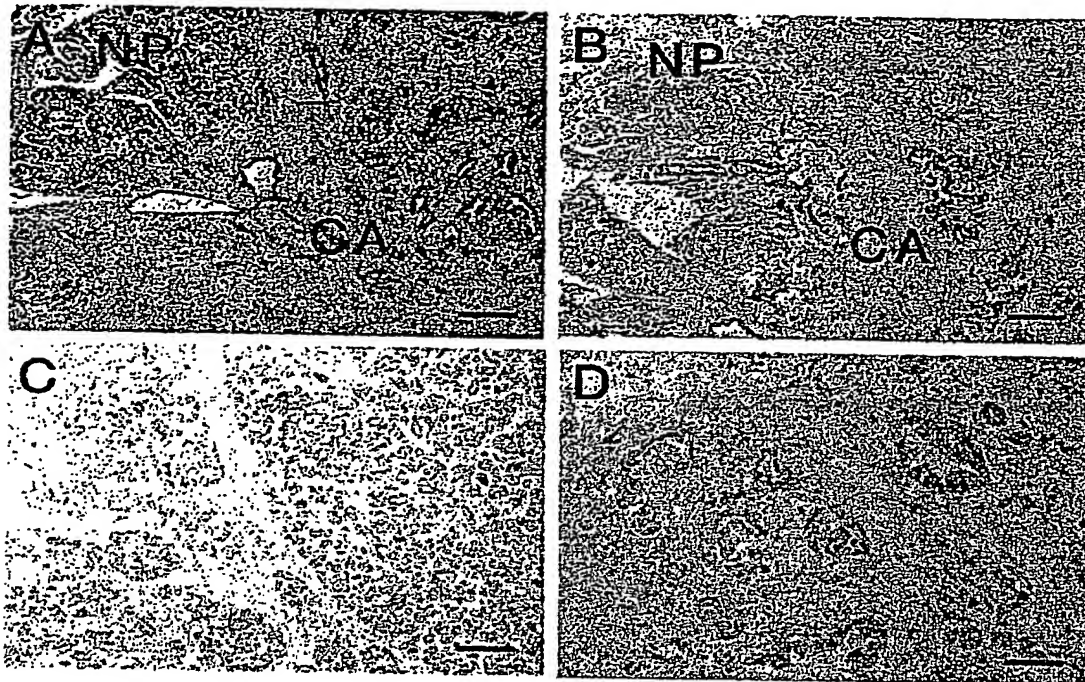


図 1 膵癌における hsp105 の免疫組織化学的解析

- A. 膵癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色。CA: 癌部、NP: 非癌部。癌部は癌細胞、間質細胞、炎症細胞を含む。非癌部は腺細胞、島細胞、膵管細胞を含む。
- B. 癌細胞に hsp105 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。
- C. 非癌部の強拡大。細胞質に弱い hsp105 蛋白の発現を認める。
- D. 癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に hsp105 蛋白の高発現を認める。
- 倍率 ;  $\times 18$  (A, B),  $\times 45$  (C, D).
- スケールバー 500 $\mu$ m (A, B), 200 $\mu$ m (C, D).

【図 2】

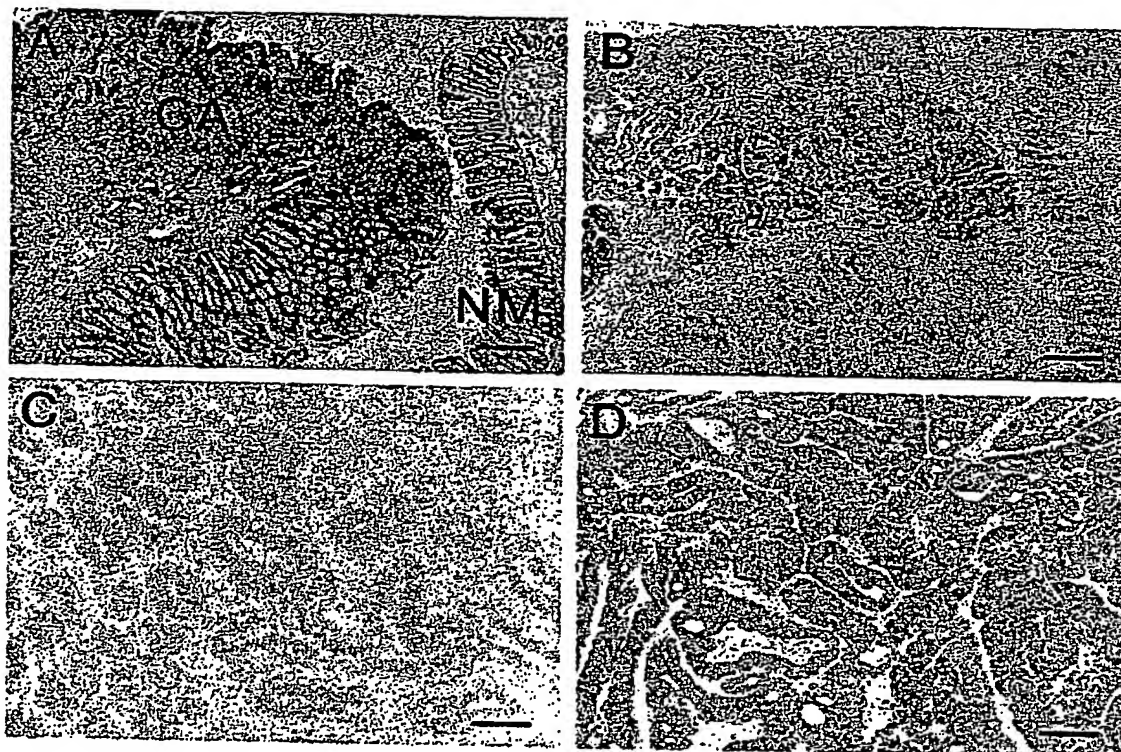


図 2 大腸癌における hsp105 の免疫組織化学的解析

A. 大腸癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色。CA: 癌部、NM: 非癌部

B. 癌細胞に hsp105 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。

C. 非癌部の強拡大。弱い hsp105 蛋白の発現を認める。

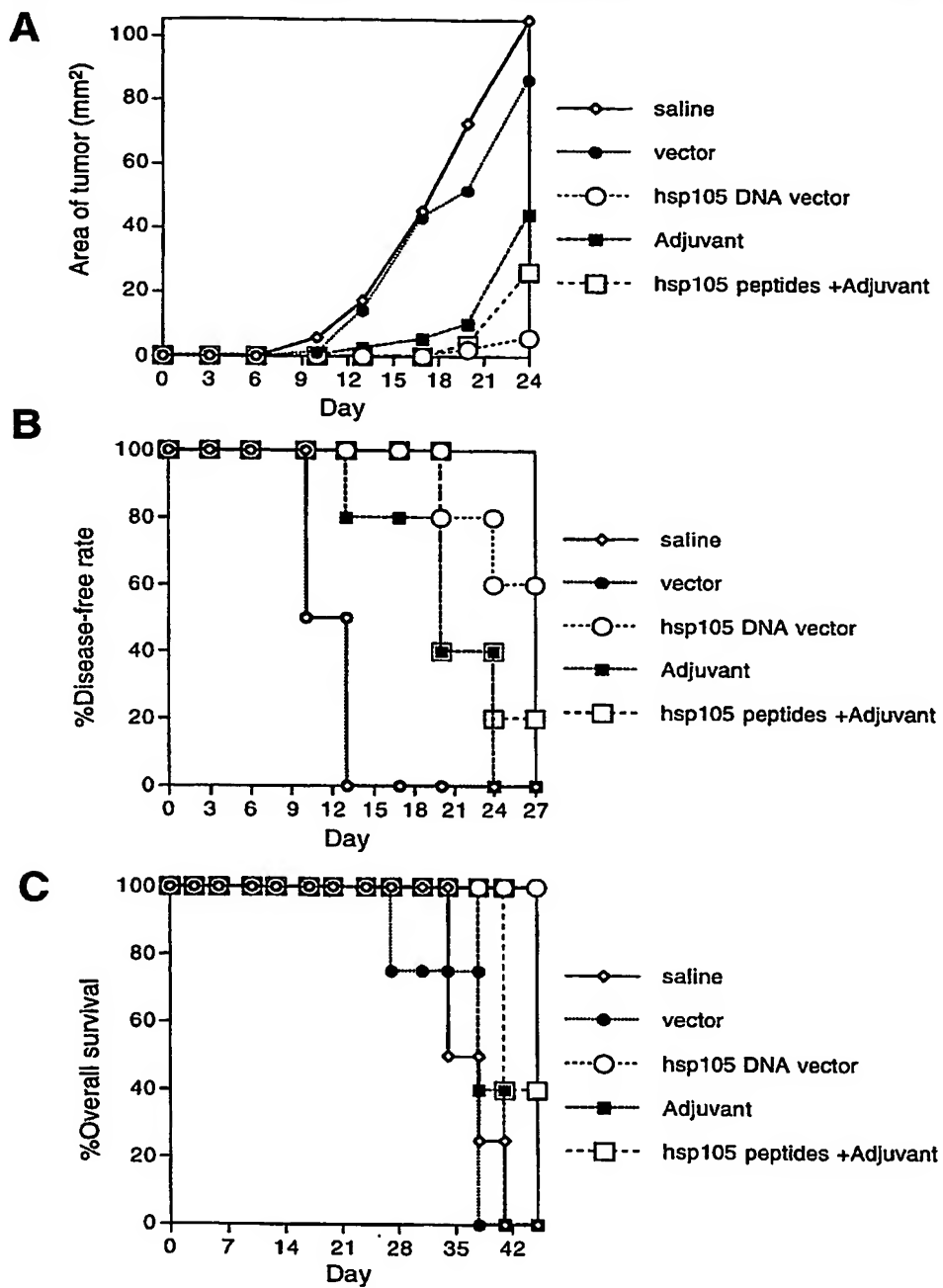
D. 癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に hsp105 蛋白の高発現を認める。核にも弱い発現を認める。

倍率:  $\times 9$  (A, B),  $\times 90$  (C, D).

スケールバー 1mm (A, B), 100 $\mu$ m (C, D).

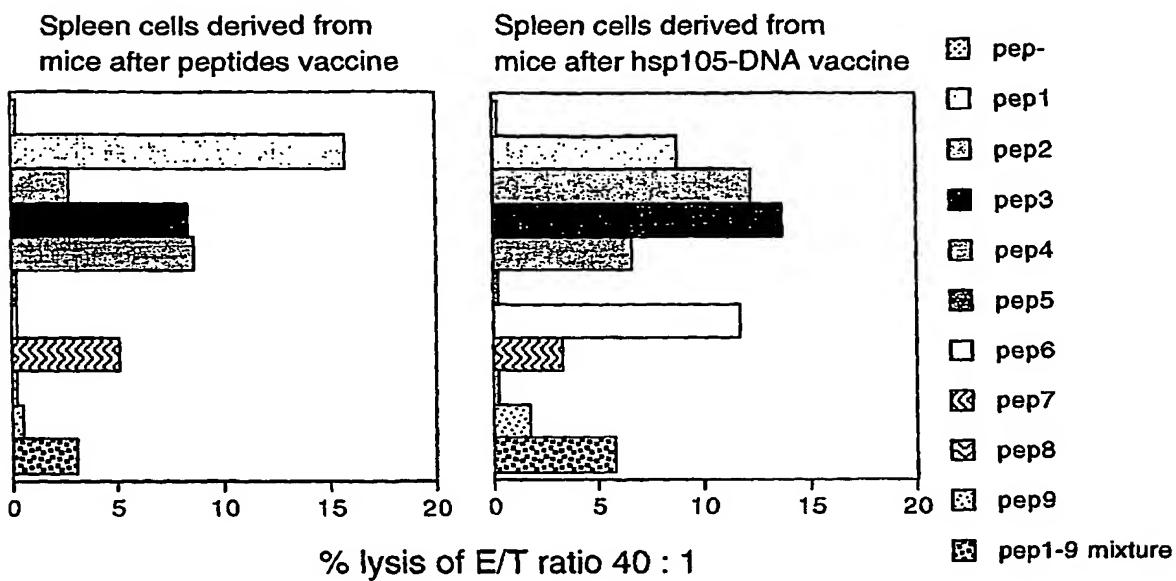
【図 3】

hsp105のDNAワクチンの接種はマウスに大腸癌細胞株Colon-26の拒絶を誘導する



【図 4】

## hsp105由来CTLエピトープの同定



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 肝癌・大腸癌をはじめとする各種癌や腫瘍の診断・治療に応用することができるヒト肝癌・大腸癌抗原や、それをコードする遺伝子、それを用いた抗癌ワクチン等を提供する。

【解決手段】 下記のいずれか。

- (a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白からなる抗原。
- (b) 上記の蛋白の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド、及び該ペプチドを含む抗癌ワクチン。
- (c) 配列番号2に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA、該DNAを含む抗癌ワクチン。

【選択図】 なし

特願 2002-341168

出願人履歴情報

識別番号

[801000050]

1. 変更年月日

2001年 9月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

熊本県上益城郡益城町大字田原2081番地10

氏 名

財団法人くまもとテクノ産業財団